梨次病毒之瓜苗檢定[1]（簡報）

楊 一 郎[2]

摘要：採集凍存本省臺中地區梨品種幼葉並製作次病毒（viroid RNAs）接種源計145個材料、經於春夏季間進行梨次病毒之瓜苗檢定（cucumber assay）結果、供試6個品種145個梨幼葉材料中、發現有27個材料在接種之胡瓜指示植物（*Cucumis sativus* L. cv. Sūyō）呈現典型 viroid 病徵。在春夏季間其初期病徵顯現之潛伏期爲43—58天。上述胡瓜病葉材料經重複回接在胡瓜（cv. Sūyō）結果皆得相同之病徵反應、該瓜苗指示植物在接種後6—8週呈現捲葉（leaf curling）及葉脈透化（vein clearing）等初期病徵、在後期呈現頂端黃化（top yellowing）及矮化（stunt）等特異性病徵。此項瓜苗檢定之病徵反應結果與日本佐野等報告之 hop stunt viroid group 相近似。

關鍵詞：次病毒、梨、瓜苗檢定、次病毒檢定。

viroid（次病毒）係美國 Diener（1971）[2]首先於馬鈴薯瘦薯病（potato spindle tuder disease）發現之新病原，與過去所知的 virus（病毒）有所不同，viroid 爲無蛋白外殼之裸露之最小單一種分子 RNA 致病體，能依賴寄主細胞而自行複製增殖並導致寄主植物病變。迄今已有25種以上之 viroid 或 viroid-like RNAs 之植物病原體之報告。在日本、佐佐木、四方及佐野等[3,4,5,6,7]報告蛇麻矮化次病毒（Hop stunt viroid, HSV），HSV group，HSV complex，並報告各種果樹之 viroid isolates，包括 grapevine isolate（HSV-g），peach isolate（HSV-pe），plum isolate（HSV-pl），citrus isolate（HSV-cit），pear isolate（HSV-p）等。梨爲無性繁殖作物，其品種材料之嫁接擴散易造成梨次病毒（Pear viroid, PV）潛存蔓延於世界各梨產地。本省梨品種材料係由日本及歐美等國外引進，是否有 PV 病源潛存有待探究。本試驗初步沿用佐野等[1,4]之 HSV-g 之瓜苗檢定法（Cucumber assay）測試本省梨各品種材料之 PV 潛存情形，供爲今後本省健康梨種苗研究繁殖之利用參考。

向日本大和種苗公司購用檢驗合格之健全胡瓜種子（*Cucumis sativus* L. cv. Sūyō），以消毒土壤在網室內播種育苗，供爲 PV 之瓜苗檢定之指示植物。

在春夏兩季間，採集臺中地區之高接梨及梨山之溫帶梨幼葉材料，包括二十世紀、新興、新世紀、幸水、豐水及橫山梨等6品種合計145個材料（表1），分別於－20°C凍存供爲 PV 接種源之製作材料。將梨幼葉片凍存材料，按佐野等[1,4]之 viroid 接種源製作方法及瓜苗檢定方法製成 PV 接種源並進行瓜苗檢定試驗。

梨幼葉冷凍材料之 PV 接種源製作過程如次：

Frozen tissue（100g）.

↓ 200ml 1M K_2HPO_4（autoclaved）

↓ 2g SDS

---

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1631 號。本研究承行政院國家科學委員會補助（NSC81—0409—B055—504），謹致謝意。

2. 本所植病系副研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

↓ 10ml 0.05% bentonite suspension (autoclaved)

↓ blended in mixer for 5 min at room temp.

↓ 100 ml phenol : chloroform (1 : 1)

↓ blended in mixer for 3 min at room temp.

↓ centrifuge at 6500 rpm, 10 min.

aqueous phase

↓ 50 ml phenol : chloroform (1 : 1)

↓ blended in mixer for 3 min at room temp.

↓ centrifuge at 6500 rpm, 10 min.

aqueous phase

↓ 2.5 vol Et-OH

↓ dry ice 1 hr.

↓ centrifuge at 6500 rpm, 10 min.

ppt (interphase)

↓ 100 ml DW

↓ 2 vol (200 ml) Et-OH

↓ dry ice 1 hr.

↓ centrifuge at 6500 rpm, 10 min.

ppt (interphase)

dissolved in

1 ml 0.1M Tris-HC1, 0.01M EDTA，0.1M NaC1. pH7.5

↓ 0.05% bentonite

Inoculum for mechenical inoculation

在春夏季間，將上述 PV 接種源以汁液接種方法[1]接種在缽栽4～6天之指示植物瓜苗乳葉，放置在25～35°C溫室約9～12週，定期施用農藥防蟲，另以無接種瓜苗爲對照，觀察記錄瓜苗檢定植物之生育及病徵出現情形。另分別在夏季及在冬季（低溫季節），將上述瓜苗檢定得到之 PV 罹病瓜葉材料分別再回接健全瓜苗乳葉，分別觀察夏季高溫及冬季低溫季節（20°C以下）不同溫度環境下對 PV 在瓜苗之病徵反應。

本試驗於春夏期高溫季節（25—35°C）在網室內進行 PV 之瓜苗檢定結果，供試之梨山地區溫帶梨之二十世紀梨13個材料中有4個材料在胡瓜指示植物呈現陽性病徵反應，新興梨15個材料中有2個呈現病徵反應。新世紀梨17個材料中有4個呈現病徵反應。臺中區坡地高接梨之東勢幸水梨14個材料中有2個呈現病徵反應，豐水梨15個材料中、有3個呈現病徵反應。橫山梨15個材料中有4個呈現病徵反應。卓蘭幸水梨14個材料中有3個呈現病徵反應，豐水梨13個材料中有2個呈現病徵反應，橫山梨15個材料中有1個呈現病徵反應。南寮橫山梨14個材料中有2個呈現病徵反應。合計供試6個品種145個梨葉片材料中有27個材料在瓜苗指示植物呈現 PV 之特殊病徵反應（表1）。另無接種之對照瓜苗皆未有病徵反應。上述瓜苗經接種 PV 6—8週後，初期的病徵反應在幼葉呈現捲葉（leaf curling）及葉脈透化(vein clearing)，後期呈現頂端黃化（top yellowing），葉片黃化（leaf yellowing）及矮化（stunt）等病徵。另在冬季低溫季節，將上述 PV 罹病瓜葉材料回接到瓜苗結果，皆未有上述病徵反應。

表1. 梨次病毒之瓜苗檢定

Table 1. Detection of pear viroids by cucumber assay

地區 Location		品種 Cultivar	供試材料數 No. of trial	瓜苗檢定結果(1) Result of cucumber assay	病徵(2) Symptoms	潛伏期 Days for Symptom development
梨	山	二十世紀	13	4/13	LC. VC. S. LY.	46—57
		新興	15	2/15	LC. VC. S. LY.	47—58
		新世紀	17	4/17	LC. VC. S. LY.	46—53
東	勢	幸水	14	2/14	LC. VC. S. LY.	48—56
		豐水	15	3/15	LC. VC. S. LY.	51—57
		橫山	15	4/15	LC. VC. S. LY.	43—51
卓	蘭	幸水	14	3/14	LC. VC. S. LY.	44—53
		豐水	13	2/13	LC. VC. S. LY.	47—51
		橫山	15	1/15	LC. VC. S. LY.	43—50
南	寮	橫山	14	2/14	LC. VC. S. LY.	47—50
合	計		145	27/145		43—58

(1) Numerator/denominator=Infected plants/inoculated plants.
(2) Symptoms appeared on the inoculated cucumber plants.
LC : leaf curling. VC : vein clearing. LY : leaf yellowing. S : stunt.

上述梨葉片材料之 PV 瓜苗檢定結果之病徵型、病徵發展情形、病徵發展潛伏期及低溫季節環境之無病徵反應現象等皆與日本佐野等[1,4,6]報告之 hop stunt viroid group 之瓜苗檢定結果相近似。又本省坡地高接梨及梨山溫帶梨品種材料係由日本引進並每年引進大量溫帶梨接穗，由此推測本省高接梨及溫帶梨普遍潛存有上述梨次病毒病 (PV) 並與日本報告之 HSV group 相關。

參考文獻

1. 楊一郎、鄧汀欽.1991. 葡萄次病毒之瓜苗檢定。中華農業研究。40(3)，249—254.
2. Diener, T. O. 1987. The Viroids. 344pp. New York, Plenum Press.
3. Sano, T., I. Uyeda, E. Shikata, T. Meshi, T. Ohno, and Y. Okada, 1985. A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. J. Gen. Virol. 66,333—338.
4. Sano, T., T. Hataya, A. Sasaki, and E. Shikata, 1986. Etrog citron is latently infected with hop stunt viroid -like RNA. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. 62,325-328・
5. Sano, T., T. Hataya, Y. Terai, and E. Shikata. 1986. Association of a viroid-like RNA from plum dapple disease occurring in Japan. Proc. Jpn Acad. Ser. B. 62,98-101・
6. Sasaki, M., and E. Shikata. 1977. Studies on the host range of hop stunt disease in Japan, Proc. Jpn. Acad. Ser. B. 55,103-108・
7. Sasaki, M., and E. Shikata. 1977. On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. 55,109-112

Detection of pear viroids by cucumber assay[1](Research Note)

I. L. Yang[2]

Summary

Pear viroid inocula were extracted from 145 leaf collections including six pear varieties cultivated in Taichung district. The pear viroids were detected in 27 out of 145 pear inoculum extractions by the viroid indexing method of cucumber assay during spring to summer season.

The pear viroid induced typical viroid symptoms on cucumber indicaror plant (*Cucumis sativus* L.cv. Sūyō) 6-8 weeks after inoculation. The infected cucumber plants showed viroid-specific symptoms of leaf curling, vein clearing, top yellowing and stunt, which were similar to those induced by hop stunt viroid group described by Sano *et al.* in Japan.

Key words : viroid, pear, cucumber assay, viroid detection.

1. Contribution No. 1631 from Taiwan Agricultural Research Institute. The study was supported by research grant from National Science Council (NSC81-0409-B055-504) .
2. Associated Plant Pathologist, Department of Plant Pathology, TARI. Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.